HISTOLOGIA DE LA PIEL DORSAL Y MARSUPIO DE *GASTROTHECA MARSUPIATA* (DUMERIL Y BIBRON) (ANURA, HYLIDAE)

por

E. TEISAIRE*, H. R. TERAN**, M. ALCAIDE DE PUCCI*,
S. MANGIONE DE MOPTY* , R. RIVAS DE PANTORRILLA*

SUMMARY

Histology of the dorsal skin and pouch of *Gastrotheca marsupiata* **(Duméril y Bibron) (Anura, Hylidae).-** We make a histomorphologic and histochemical study of the tegument of the dorsal skin and marsupial pouch of *Gastrotheca marsupiata* (D & B) employing techniques for optic microscopy. Experimentally we provoked the development of the pouch by adminisering strogen. We describe the morphology of epidermis and dermis. We notice glandúlar types, cromatophor disposition, dermic fibrilar element organization, vascularization and nervous components. By means of histochemical techniques we sort out gland types and secretion characterization and detect two types of mucous glands in addition to serous glands. We likewise detect the presence of a layer of smooth muscle with a greter development in the region of the marsupial pouch opening.

INTRODUCCION

La denominación que reciben, de ranas marsupiales, alude al hecho de que la incubación de los embriones se realiza en una bolsa o "marsupio" situado en el dorso de la hembra, inmediatamente por debajo de la piel. Este tipo de estructura destinada a la incubación embriónica, es típica de numerosas especies (39) de tres géneros de hílidos, *Gastrotheca, Flectonotus* y *Amphignathodon* (Duellman y Maness, 1980). Una copiosa bibliografía sobre este tema ha surgido en los últimos años, en la que se abordan temáticas tales como: la descripción morfológica y tipificación de las distintas modalidades de bolsa marsupial (Hoogmoed, 1967; Del Pino, 1980; Duellman y Manes, 1980); las características del ovario, embriogénesis y probables relaciones del embrión con el tegumento del marsupio (Del Pino, 1975; Del Pino y Ellison, 1984); la descripción de las larvas de especies del género *Gastrotheca* (Laurent et al, 1986); y los distintos aspectos del comportamiento de la hembra durante el parto (Barrio, 1976; E. Terán, comunicación oral).

La especie que nos ocupa, *G. marsupiata*, presenta modalidades que le son propias, tienen una distribución geográfica circunscripta a los Andes, del centro de Perú y sur de Bolivia, a una altura entre los 2.700 y 3.700 metros sobre el nivel del mar (Duellman y Fritts, 1972).

Es indudable que la incubación embriónica restringida a una bolsa dorsal, formada por un pliegue del tegumento, confiere a estas especies características reproductivas y embriológicas muy interesantes en diferentes as-

* Facultad de Ciencias Naturales, U. N. T. Fundación Miguel Lillo.
** Fundación Miguel Lillo - CONICET.
Trabajo presentado en las VII jornadas Argentinas de Zoología y en las Iª Jornadas Científicas de la Sociedad de Biología de Tucumán, Argentina.

pectos biológicos. De los cuales destacamos la relación embrión-hembra, con la consecuente importancia adquirida por el tegumento del marsupio, ya que de realizarse algún tipo de intercambio, gaseoso o de cualquier nutriente (Del Pino, et al., 1975; Del Pino y Escobar, 1981) se llevaría a cabo a través del epitelio marsupial. Es por esto que nuestro estudio se refiere a aspectos histomorfológicos, tanto del tegumento dorsal como del de la bolsa marsupial, para destacar diferencias morfológicas correlacionadas con la función específica de estas estructuras. Al igual que se realiza un estudio histoquímico de secciones, a fin de identificar diferentes tipos glandulares. Tales observaciones nos llevaron a evaluar comparativamente los diferentes componentes tegumentarios, constatando su grado de desarrolo a nivel de la piel dorsal y del marsupio.

MATERIAL Y METODOS

Se trabajó con hembras coleccionadas en Río Vinto (2.100 mts. de altura) Dpto. Cochabamba, Bolivia. Fueron procesadas en una época del año que corresponde, en su ciclo de vida, al período de inactividad sexual. Cabe aclarar que dichas hembras parieron entre 4 a 5 meses antes de la elaboración de este trabajo.

El desarrollo del marsupio se obtuvo por la administración de estrógeno en forma de estradiol, en una única dosis por vía oral, de aproximadamente 0,25 mg, constatándose su efecto por cambios morfológicos externos en la abertura de la bolsa situada dorsalmente en la parte posterior del cuerpo, que se verificó a los 12 días de suministrada ésta, por una elevación y plegamiento de los bordes de la abertura en forma de V invertida.

Tanto en las hembras tratadas como en las control, se extrajo la parte posterior de la piel, procediéndose a su fijación con líquido de Bouin y su posterior inclusión en paraplast. Se realizaron cortes seriados de 6 μm de espesor.

Se emplearon distintas técnicas de tinción; para estudios morfológicos se utilizaron Hematoxilina de Mayer-Eosina (en adelante HE) y coloración Mallory (Azan) Heidenhain (en adelante MA); en tanto que, como técnicas histoquímicas especiales para detección de contenidos y secreciones celulares, se ensayaron el método del ácido periódico-Schiff (en adelante PAS) para determinar la presencia de grupos 1, 2 glicol en mucopolisacáridos, mucoproteínas, mucinas neutras y ácidas periodatoreactivas de acuerdo a Humason (1979). Alcian Blue 8GS a pH 2,5 (en adelante AB. 2,5) para la detección de grupos carboxilos y algunos sulfatos de mucopolisacáridos ácidos. Alcian Blue 8GS a pH 2,5 (en adelante AB. 0,5) según Spicer (1964) para la detección de mucopolisacáridos sulfatados. Para la confirmación de la técnica anterior algunas secciones fueron teñidas con Azul de Toluidina (en adelante TB) a pH 5,6 y 3,5 en buffer de Michaelis, que identifica polimeros de carbohidratos sulfatados con radicales altamente ionizables,en forma metacromática y alcohol resistente según Sylven (1961). Michaelis (1947) afirma que se determinan variedades de metacromasia según el espectro de absorción del complejo colorante-tejido resultante en tres bandas: alfa, beta y gama. Se emplearon secuencias combinadas a pH 0,5 y 2,5 con PAS según Mowry y Winkler (1956), que permiten la determinación simultánea de mucopolisacáridos y mucoproteínas ácidas (sulfatadas, fosfatadas, acetiladas, siálico) y neutras.

RESULTADOS

Piel dorsal: está estructurada, en forma típica, por una epidermis y una dermis distribuidas de acuerdo a un patrón común en anfibios (Goin et al, 1978; Porter, 1972). La primera está constituída por un epitelio pluriestratificado, dividido en 2 zonas: una profunda, el estrato germinativo, que asegura la renovación de la capa externa o estrato córneo, donde las células se queratinizan y mueren formando la parte más superficial (fig. 1).

La epidermis recubre un tejido conectivo denso, la dermis, que a su vez se diferencia en un estrato laxo y uno compacto. La membrana basal reforzada por una condensación

de fibras colágenas, señala el límite entre epidermis y dermis. El primer estrato, de estructuración laxa, es relativamente rico en células donde encontramos fibroblastos y cromatóforos, estos últimos distribuidos en forma característica ordenados en capas de lipóforos, guanóforos y melanóforos. Es en esta región, donde se manifiesta una abundante vascularización, además se encuentran pequeños vasos linfáticos y componentes nerviosos, así mismo es la zona donde están incluidas las distintas variedades glandulares de orígen epidérmico que drenan en la superficie de la piel, sobre las que nos referiremos más adelante.

A continuación, en la capa más profunda se distingue el estrato compacto de la dermis, conformado por haces de fibras colágenas con una distribución característica en fascículos ordenados en 3 dimensiones (fig. 1). A intervalos más o menos regulares, los haces fibrilares son atravesados por fibras de musculatura lisa acompañados de fibras elásticas, puestas en evidencia mediante la técnica de aldehído fucsina, que llegan a rodear las formaciones glandulares (fig. 4), e incluso sus extremos más superficiales alcanzan la parte basal del epitelio pluriestratificado. A esta zona le sigue una capa profunda, discontinua e irregular de cromatóforos.

Glándulas: por su morfología se consideran de tipo alveolar, diferenciándose en serosas y mucosas. Las glándulas serosas, de tamaño mayor que las mucosas (fig. 1), presentan un contenido granular en la cavidad, con límites granulares que varían de difusos a netamente definidos según el estado de formación de la secreción. En los cortes, la glándula presenta un contorno oval, con las células secretoras dispuestas en los bordes hasta el cuello, lugar de origen del conducto formado por una doble capa de células cúbicas bajas. Los núcleos de las células secretoras se encuentran hacia la base, su forma varía de redondeada a fusiforme, en respuesta a la presión ejercida por el material almacenado. Toda esta estructura se encuentra encapsulada por una delgada capa de fibras musculares lisas, que probablemente intervienen para ayudar a la expulsión de la secreción (fig. 1).

Las glándulas mucosas, de menor tamaño y más numerosas que las anteriores, se ubican al igual que las serosas en el estrato laxo de la dermis. Son de tipo alveolar con un corto conducto que atraviesa la epidermis para drenar en el exterior, éste está formado por una doble capa de células cuboidales del mismo modo que lo observado en las glándulas serosas (fig. 2). La pared glandular está tapizada por células secretoras de núcleos aplanados y ubicados en la base, en tanto, la zona apical de la célula está ocupada por gránulos de secreción de diferentes características tintoriales. En este sentido hemos podido distinguir 2 tipos de glándulas, de acuerdo a diferencias observadas en las granulaciones de las células glandulares. El primer tipo, al que denominamos "A", está constituído por células con granulaciones eosinófilas y otras con granulaciones débilmente basófilas que conforman un mosaico celular, a éstas se agregan 2 células eosinófilas y de núcleo central que forman parte del cuello glandular (fig. 2). El segundo tipo, al que denominamos "B", presenta células con granulaciones fuertemente basófilas y un contenido homogéneo en la luz glandular. Dadas las diferencias morfológicas se emplearon técnicas especiales para discriminar estos 2 tipos glandulares, es así como en las glándulas de tipo "A" se observó que las células con granulaciones eosinófilas tienen una correspondencia tintorial con una PAS positividad débil; se destaca la ausencia de respuesta al AB 0,5 y 2,5, en tanto que con TB 5,6 hay una reacción ortocromática en el citoplasma de las células del cuello y en las de la base glandular. En tanto en las glándulas tipo "B", con intensa basofilia en los gránulos, de secreción, se presenta alcianofilia a pH muy bajos y una rección metocromática con TB 5,6 y 3,2, lo que corroboraría la presencia de mucopolisacáridos ácidos en los contenidos celulares (fig. 3). Es destacable la correspondencia en cuanto a respuestas tintorial con respecto al aldehído-fucsina, de estos mismos gránulos de las células secretoras, indicando la presencia de compuestos ácidos tanto en forma de vesículas citoplasmáticas como en la luz glandular (fig. 4). Estos 2 tipos glandulares, al igual que

las serosas, se encuentran englobados por una cápsula de tejido conectivo, constatándose en algunos casos la presencia de fibras de músculo liso en ésta.

Marsupio: el tegumento de la bolsa está estructurado en forma similar al de la piel, con una constitución mixta, epidermis y dermis. La primera está formada por un epitelio pluriestratificado muy plegado, con una capa córnea menos desarrollada que en la piel; inmeditamente por debajo de la membrana basal del epitelio encontramos la dermis con sus 2 estratos, laxo o esponjoso y compacto, en el primero se identifica la capa de cromatóforos, una gran vascularización por la presencia de pequeños vasos sanguíneos y linfáticos, formaciones nerviosas y los distintos tipos glandulares. En el siguiente estrato, las formaciones fibrilares predominantemente de colágeno se ubican en forma desordenada y están atravesadas a intervalos por fibras de músculo liso. A continuación encontramos una red profunda de cromatóforos que marcan el límite del estrato compacto con una capa de musculatura lisa; estas fibras se distribuyen principalmente en sentido longitudinal con respecto al eje anteroposterior del cuerpo, y en menor proporción hay células musculares dispuestas en sentido transversal y oblicuo, a pesar de no existir una disposición en capas bien definidas, la parte más interna se compone preferentemente de fibras musculares longitudinales; esta capa muscular adquiere un mayor desarrollo en la zona que corresponde a la abertura de la bolsa (fig. 6). En la composión de esta gruesa capa, intervienen además fibras de colágeno y elastina interpuestas entre las fibras musculares lisas.

Glándulas: se pudo constatar la presencia tanto de glándulas serosas como mucosas. A diferencia de lo que ocurre en la piel se encuentran muy pocas de secreción serosa, en tanto que las mucosas son morfológicamente similares a las de tipo "A" de la piel, presentando las células secretoras citoplasma con granulaciones débilmente basófilas y/o eosinófilas muy poco diferenciables dado que el citoplasma presenta aspecto esponjoso, los núcleos redondeados están situados en la base. No se obtuvieron respuestas tintoriales con coloraciones histoquímicas especiales (fig. 7).

Toda la unidad secretora, de las glándulas serosas y mucosas, se encuentra encapsulada por una formación fibrilar constituída por musculatura lisa, fibras de colágeno y elásticas (fig. 8).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El limitado número de ejemplares con que contamos para nuestro trabajo nos plantea interrogantes en lo referente a aspectos biológicos de *G. marsupiata*, es por ello que éste constituye un aporte al conocimiento de la estructura histológica de la piel y el tegumento del marsupio; en condiciones experimentales por la administración de estrógeno exógeno, se obtuvo el desarrollo de la bolsa marsupial, basándonos en datos bibliográficos en los que se comprueba que el estrógeno induce a la formación de esta estructura tegumentaria que contiene los embriones durante el desarrollo (Jones et al., 1973).

Nuestros resultados experimentales nos señalan un ciclo de reducción y proliferación del tegumento de la bolsa, en relación con un flujo hormonal de estrógeno. En tanto que en aquellas hembras sin acción hormonal, el marsupio queda reducido a un simple repliegue de la piel dorsal que marca la abertura de la bolsa casi imperceptible en cortes histológicos. Este hecho estaría indicando una renovación total del tegumento marsupial al iniciarse la faz reproductiva del ciclo, coincidiendo con el desprendimiento de restos epiteliales observado por Barrio (1976) en partos de *G. christiani* Laurent.

Otro aspecto interesante de destacar en el tegumento del marsupio, es la presencia de una capa muscular de gran desarrollo constituída por fibras lisas con una disposición longitudinal predominante. En observaciones realizadas por E. Terán (comunicación personal) en los partos producidos en laboratorio, pudo constatar una serie de movimientos por debajo de la piel y a lo largo del eje dorsal, que atribui-

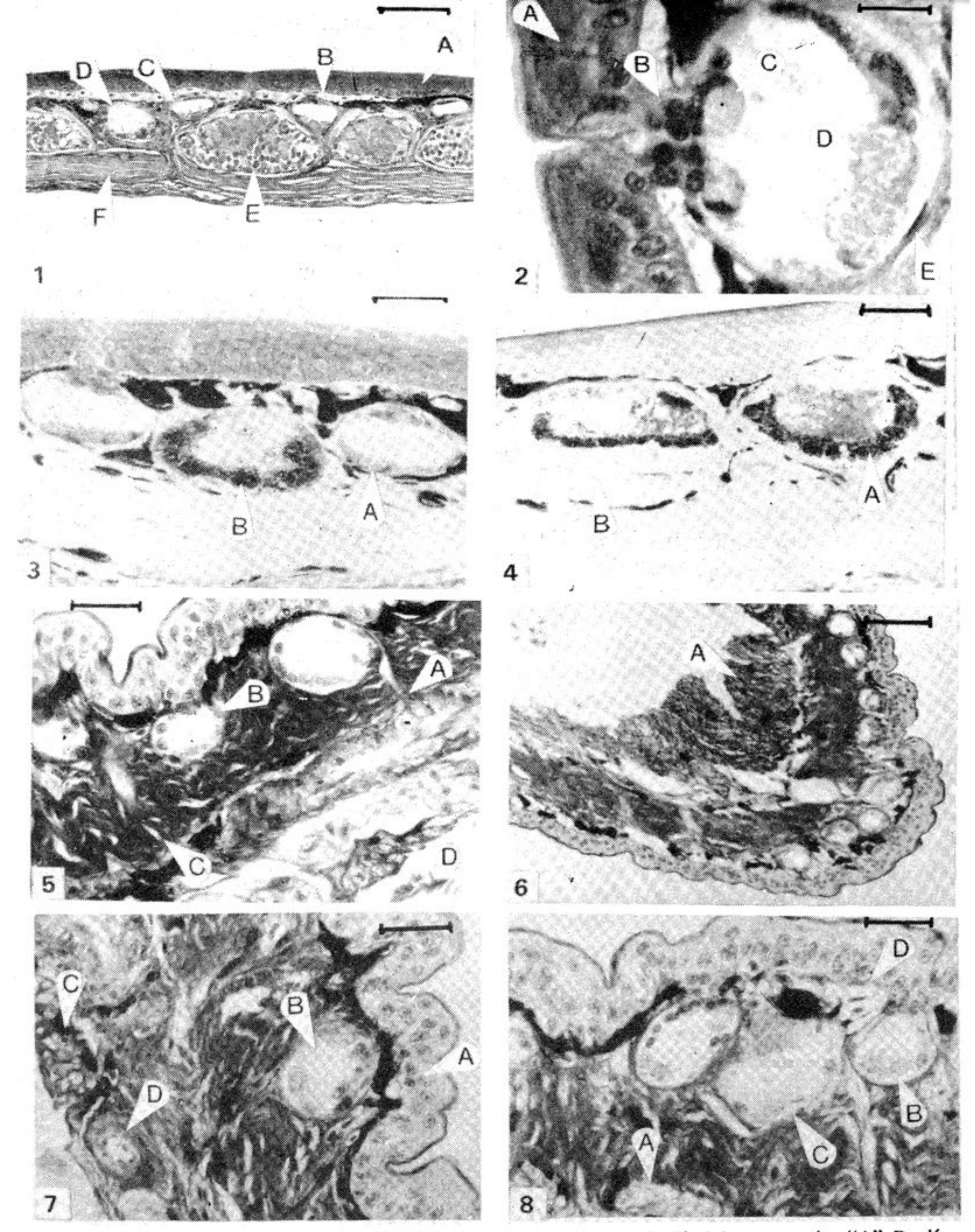


Fig. 1.– A: epitelio estratificado queratinizado; B, capa de cromatóforos; C, glándula mucosa tipo "A"; D, glándula mucosa tipo "B"; E, glándula serosa; F, estrato compacto de la dermis. (H. E.), Barra = 210 µm; 2: glándula mucosa tipo "A": A, epitelio estratificado; B, conducto glandular; C, células eosinofilas del cuello glandular; D, granulos basófilos en células secretoras; E, cápsula fibrosa de la glándula. (H. E.), Barra = 12 µm; 3: A, glándula mucosa tipo "A", ortocromacia en células secretoras; B, glándula mucosa tipo "B", gránulos metacromáticos en células secretoras. (TB 5,6), Barra = 32 µm; 4: glándula mucosa tipo "B": A, gránulos de secreción con reacción positiva; B, fibras elásticas de la cápsula glandular. (Aldehido Fucsina), Barra = 32 µm; 5: A, as muscular hacia la epidermis; B, glándula mucosa; C, capa de colageno con distribución irregular; D, paquete nervioso. (Mallory), Barra = 32 µm; 6: A, capa profunda de músculo liso en la abertura de la bolsa. (Mallory), Barra = 80 µm; 7: A, epitelio plegado; B, glándula mucosa; C, músculo liso; D, vaso sanguineo. (Mallory), Barra = 32 µm; 8: A, músculo liso; B, glándula mucosa; C, glándula serosa; D, capa de cromatóforos. (Mallory), Barra = 32 µm.

mos a esta capa muscular que ayudaría a la expulsión de las larvas en el momento del parto. Por otro lado el mayor desarrollo de la musculatura en la región de la abertura, correspondería a una estructura con función de apertura y cierre del orificio que comunica la bolsa con el exterior.

En lo referente a la población glandular, se destaca la disminución en número de las glándulas serosas en el tegumento marsupial, en tanto que, las glándulas mucosas muy numerosas se caracterizan por presentar una estructura típica, y dada la respuesta tintorial de éstas se encontrarían en una etapa de inactividad secretoria.

Se señala en la piel dorsal la presencia de 2 tipos de glándulas mucosas, en las cuales los resultados morfológicos e histoquímicos ponen en evidencia diferentes contenidos de secreción, desde mucinas neutras a mucopolisacáridos ácidos sulfatados y fosfatados. Es así como, discriminamos la glándula tipo "A" con células secretoras cuyos contenidos se manifiestan en forma de un mosaico de gránulos basófilos y eosinófilos ubicados en células diferentes, además con 2 células situadas en el cuello glandular con un citoplasma con reacción eosinófila, correspondiendo una débil PAS positividad con la eosinofila citoplasmática, lo que estaría indicando la presencia de mucinas neutras. En el tipo "B", en cambio, al obtenerse una respuesta tintorial a colorantes tiazínicos con una marcada metacromasia alcohol resistente, se destaca sin lugar a dudas la presencia de secreciones ácidas de tipo sulfatadas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Instituto de Herpetología de la Fundación Miguel Lillo y en particular al Sr. Enrique M. Terán, por el material vivo y la bibliografía facilitada para la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

BARRIO, A., 1976. Observaciones sobre la reproducción de *Gastrotheca christiani* Laurent (Anura, Hylidae).- Physis *36* (92): 337 - 344.

DEL PINO, E. M., 1975. Adaptaciones reproductivas para la vida terrestre del sapo marsupial *Gastrotheca riobambae* (Fowler) (Anura, Hylidae).- Rev. Univ. Católica Quito *3* (8): 119 - 140.

——— 1980. Morphology of the pouch and incubatori integument in marsupial frongs (Hylidae).- Copeia *1:* 10 - 17.

DEL PINO, E. M., M. GALARZA, C. M. DE ALBUJA, y A. A. HUMPHRIES, 1975. The maternal pouch and development in the marsupial frog, *Gastrotheca riobambae* (Fowler).- Biol. Bull. *149:* 480 - 491.

DEL PINO, E. M. y B. ESCOBAR, 1981. Embryonic stages of *Gastrotheca riobambae* (Fowler) during maternal incubation and comparison of development with that of other egg-brooding hylid frogs.- J. Morph. *167:* 277 - 295.

DEL PINO, E. M. y R. P. ELLISON, 1984. A novel development pattern for frogs: gastrulation produces an embryonic disk.- Nature *306* (5943): 589 - 591.

DUELLMAN, W. E. y T. H. FRITTS, 1972. A taxonomic review of the Southern Andean marsupial frogs (Hylidae: *Gastrotheca*).-

DUELLMAN, W. E. y S. J. MANESS, 1980. The reproductive behavior of some hylid marsupial frogs.- Br. J. Herpet. *14* (3): 213 - 222.

GOIN, C. J., O. B. GOIN, y G. R. ZUG, 1978. Introduction to Herpetology.- Freeman, XI, 378 pp.

HOOGMOED, M. S., 1967. Mating and early development of *Gastrotheca marsupiata* (Duméril and Bibron) in captivity (Hylidae, Anura, Amphibia).- Br. J. Herpet., *4:* 1 - 7.

JONES, R. E., A. M. GERRARD, y J. J. ROTH, 1973. Estrogen and brood puch formation in the marsupial frog, *Gastrotheca riobambae*.- J. Exp. Zool. *184:* 177 - 184.

HUMASON, G. L., 1979. Animal tissue techniques.- Freeman, USA, IX, 661 pp.

LAURENT, R. F., E. O. LAVILLA, y E. M. TERAN, 1984. Contribución al conocimiento del género *Gastrotheca* Fitzinger (Amphibia, Anura, Hylidae) en Argentina.- Acta Zool. Lillona. *38* (2).

MICHAELIS'L., 1974. Cold. Spr. Harb. Sump. quant. en Histoquímica (A. G. E. Pearse, dir.), Aguilar, Madrid pp. 165 - 166.

MOWRY, R. W. y C. H. WINKLER, 1956. The coloration of acidic carbohydrates of bacteria and fungi in tissue section with special reference to capsules of Cryptococcus, Phneumococci and Staphylococci.- Amer. J. Path, 32 - 628.

PORTER, K. R. 1972. Herpetology.- Saunderss, London, XI + 524 pp.

SPICER, S. S. y R. LEV, 1964. Specific staining of sulphate groups eith Alcian Blue at low B.H. .- J. Histochem. Cytochem. *12:* 309.

SYLVEN, B., 1961. Histochemistry. Theorical and applied. Evenson Pearse, London, 253 pp.-